

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-62255

(P2002-62255A)

(43) 公開日 平成14年2月28日 (2002. 2. 28)

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

F I

データ* (参考)

G 0 1 N 21/27

C 0 1 N 21/27

C 2 G 0 4 3

21/05

21/05

2 G 0 5 7

21/64

21/64

C 2 G 0 5 9

審査請求 未請求 請求項の数3 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号

特願2000-250424(P2000-250424)

(22) 出願日

平成12年8月22日 (2000. 8. 22)

(71) 出願人 000230467

日本レーザ電子株式会社

名古屋市熱田区三本松町20番9号

(71) 出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(72) 発明者 武田 茂樹

神奈川県横浜市港南区日野南七丁目15番地
3号

(72) 発明者 芳賀 達也

神奈川県逗子市沼間2-3-1-411

(74) 代理人 100081466

弁理士 伊藤 研一

最終頁に続く

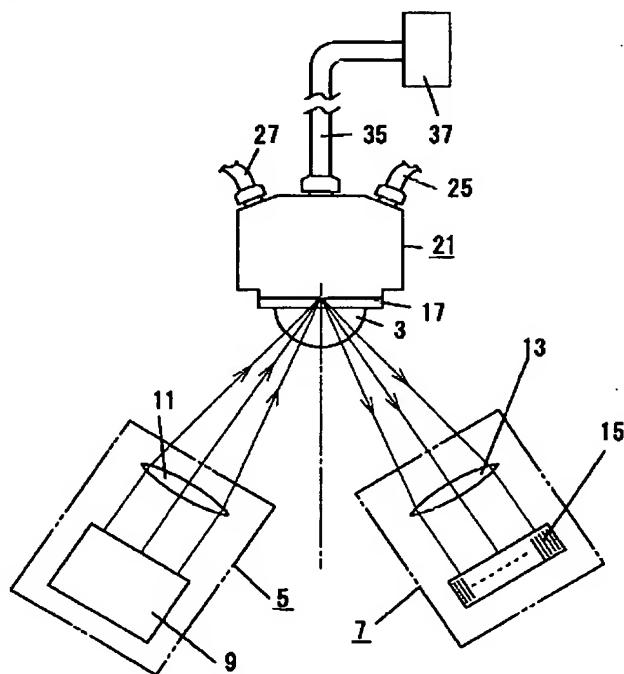
(54) 【発明の名称】 表面プラズモン共鳴角と蛍光の同時検出装置

(57) 【要約】

(修正有)

【課題】 SPR法と蛍光検出法を組み合わせることにより被検体の特性を高精度に検出することができる表面プラズモン共鳴角及び蛍光同時検出装置を提供する。

【解決手段】 光源9からの光を所定角度幅で、基板17における金属薄膜の境界に照射すると共に該境界からの反射光を前記所定の角度幅に形成して第1受光部材15に受光させる。基板にセルブロックを密着して光の照射領域に応じた箇所に供給される蛍光物質が標識された被検体溶液を流通させる。光が照射される基板箇所に相対するセルブロック21に第2受光部材37を設け、試料プローブに結合した被検体に標識された蛍光物質からの蛍光を受光させる。第1受光部材により検出される表面プラズモン共鳴角と基板における金属薄膜の境界にて光が全反射する際に生じるエバネッセント波により励起される蛍光物質からの蛍光とに基づいて試料プローブに結合した被検体を検出する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】表面に製膜された金属薄膜に試料プローブが固定され、光が透過可能な基板と、光源からの所定角度幅の光を密着された基板における金属薄膜の境界に照射すると共に該境界からの反射光を前記所定の角度幅に形成して第1受光部材に受光させるプリズムと、基板に密着され、光の照射領域に応じた箇所に供給される蛍光物質が標識された被検体溶液を流通させるセルを有したセルブロックと、光が照射される基板箇所に相対するセルブロックに設けられ、試料プローブに結合した被検体に標識された蛍光物質からの蛍光を受光する第2受光部材とからなり、試料プローブに結合した被検体を表面プラズモン共鳴角及び蛍光により検出可能にした表面プラズモン共鳴角及び蛍光同時検出装置。

【請求項2】請求項1において、第1及び第2受光部材からの電気信号を所定のサンプリング時間ごとに読み込み、試料プローブに結合した被検体を表面プラズモン共鳴角及び蛍光により特定可能にした表面プラズモン共鳴角及び蛍光同時検出装置。

【請求項3】請求項1において、第2受光部材は蛍光を導波する光ファイバーと、光ファイバーを介して導波される蛍光の光強度に応じた電気信号を出力する受光素子とからなる表面プラズモン共鳴角及び蛍光同時検出装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】本発明は、例えば細胞、ウイルス、バクテリア等の蛋白質、糖、酵素やDNA、RNA等のヌクレオチド等の各種被検体の特性を検出する表面プラズモン共鳴角及び蛍光同時検出装置に関する。

【0002】

【発明が解決しようとする課題】ガラス基板上に製膜された金(Au)、銀(Ag)等の金属薄膜上に固定された試料プローブにより被検体の特性を検出する装置として表面プラズモン共鳴角検出装置(以下、SPR装置という)が知られている。

【0003】このSPR装置は、プリズム上に密着されたガラス基板における金属薄膜の境界にレーザ光を臨界角以上で照射し、試料プローブに対する被検体の結合の有無により該境界からの反射光強度が最小、従って被検体への吸光が最大になる共鳴角の変化を検出して被検体の特性を検出している。

【0004】しかしながら、該SPR装置にあっては、共鳴角の変化が微小であるため、共鳴角変化を正確に判別できず、被検体の特性を高い精度で検出するのが困難であった。

【0005】また、例えばDNA等のように試料プローブに対する相補関係により被検体の種類を特定する方法としては、上記したSPR法の他に、ガラス基板上に固定された試料プローブに、蛍光物質が標識された被検体

を結合させた後、夫々の試料プローブに光を照射し、相補関係になった被検体に標識された蛍光物質が励起された際の蛍光を検出して被検体を特定する蛍光検出法が知られている。

【0006】この方法にあっては、蛍光物質を励起させる励起光に比べて蛍光の光強度が極めて低いため、蛍光を検出する際に反射した励起光から蛍光を高い精度で弁別して検出することが困難であった。

【0007】本発明は、上記した従来の欠点を解決するために発明されたものであり、その課題とする処は、SPR法と蛍光検出法を組み合わせることにより被検体の特性を高精度に検出することができる表面プラズモン共鳴角及び蛍光同時検出装置を提供することにある。

【0008】また、本発明の他の課題は、被検体を蛍光検出する際には励起光等の影響をなくして蛍光を高精度に検出することができ、被検体自体の検出精度を向上することができる表面プラズモン共鳴角及び蛍光同時検出装置を提供することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明は、表面に製膜された金属薄膜に試料プローブが固定され、光が透過可能な基板と、光源からの所定角度幅の光を密着された基板における金属薄膜の境界に照射すると共に該境界からの反射光を前記所定の角度幅に形成して第1受光部材に受光させるプリズムと、基板に密着され、光の照射領域に応じた箇所に供給される蛍光物質が標識された被検体溶液を流通させるセルを有したセルブロックと、光が照射される基板箇所に相対するセルブロックに設けられ、試料プローブに結合した被検体に標識された蛍光物質からの蛍光を受光する第2受光部材とからなる。

【0010】そして第1受光部材により検出される表面プラズモン共鳴角と基板における金属薄膜の境界にて光が全反射する際に生じるエバネッセント波により励起される蛍光物質からの蛍光とに基づいて試料プローブに結合した被検体を検出する。

【0011】

【発明の実施形態】以下、本発明の実施形態を図に従って説明する。図1及び図2において、表面プラズモン共鳴角及び蛍光同時検出装置1のフレーム(図示せず)には半円柱プリズム3が、その湾曲外周面を下方に向けて取り付けられている。該半円柱プリズム3の中心鉛直線の図示する左側外周面側には光照射装置5が、また図示する右側外周面側には第1受光装置7が夫々配置されている。

【0012】光照射装置5は、後述する蛍光物質を励起する特定波長のレーザ光を出力するレーザ光源9と、該レーザ光源9から出力される所定角度幅のレーザ光を、後述するガラス基板17における金属薄膜17aとの境界にて所定のビーム径に収束させる光学レンズ11とから構成される。

【0013】なお、ガラス基板17における金属薄膜17aの境界に対する光の照射形態としては、光学レンズ11により前記境界にて収束させる形態の他に金属薄膜17aの境界に対して所定の領域全体に光を照射するように平行光或いは拡大光としてもよい。

【0014】第1受光装置7は前記境界から反射した所定角度幅のレーザ光を平行光にする光学レンズ13と、共鳴角の検出分解能を有したフォトダイオードアレイまたはCCD等の第1受光部材15とから構成される。

【0015】半円柱プリズム3の上平面にはセンサーチップの一部を構成するガラス基板17がマッチングオイルやシリコンシート等の密着部材(図示せず)を介して密着される。ガラス基板17、密着部材及び半円柱プリズム3はほぼ一致する光屈折率(1.5~2.0)からなり、ガラス基板17の上平面には微小膜厚の金薄膜または銀薄膜等からなる金属薄膜17aが製膜され、該金属薄膜17aには細胞やバクテリア、ウイルス等の被検体に応じた抗体や試薬、または被検体がヌクレオチドの場合にはDNAプローブ、RNAプローブ等の試料プローブ19が吸着固定されている。

【0016】ガラス基板17の上平面にはセンサーチップの一部を構成するセルブロック21が、上記密着部材(図示せず)を介して密着される。該セルブロック21の下面には金属薄膜17aにおける検出領域とほぼ一致する大きさのフローセル23が所定の深さで形成され、例えば図示するフローセル23右側のセルブロック21には金属薄膜17aにより閉鎖されたフローセル23内に、蛍光物質が標識された被検体を含む水溶液26を供給する供給流路27が、また図示するフローセル23左側のセルブロック21にはフローセル23からオーバーフローした水溶液を回収するための排出流路29が夫々形成される。

【0017】供給流路27及び排出流路29間のセルブロック21には取付け孔31が、半円柱プリズム3の中心鉛直線と一致する軸線を有して形成され、該取付け孔31内には先端面に集光レンズ35aを有した第2受光手段の一部を構成する光ファイバー35の一端部が挿嵌されている。

【0018】そして光ファイバー35の他端部にはフォトダイオードやCCD等の第2受光部材37が取り付けられ、該第2受光部材37は被検体に標識された蛍光物質がエバネッセント波により励起された発光する蛍光を受光して電気信号を出力する。

【0019】図3において、CPU41にはサンプリング回路43が接続され、該サンプリング回路43は内蔵されたクロック回路417aによる所定のサンプル時間毎に、第1及び第2受光部材15・37から出力される電気信号を夫々読み込み、読み込んだアナログ電気信号をA/D変換回路43bにより2値化信号(デジタル信号)へ変換する。

【0020】CPU41はA/D変換したサンプル時間毎の受光部材15及び第2受光装置37の検出データをRAM45のバッファ領域45aに記憶させる。そしてCPU41はROM47に記憶されたプログラムデータに基づいてRAM45に記憶された各検出データと予め設定されたサンプル時間とに基づいて、受光部材15に関しては共鳴角変化と時間、第2受光部材37に関しては蛍光強度に対応する電圧と時間とによるグラフデータを演算処理してRAM45の表示バッファ領域45bに記憶させる。

【0021】そしてCPU41は接続されたCRT、LCD等の表示装置49に、RAM45の表示バッファ領域45bに記憶されたグラフデータを表示させる。なお、CPU41はRAM45のプリントバッファ領域45cに記憶されたプリントデータを印字装置51に出力して印字させてもよい。

【0022】次に、上記表面プラズモン共鳴角及び蛍光同時検出装置1による検出作用及び検出方法を被検体としてDNAを使用する場合を例にして図4~図6により説明する。

【0023】まず、検出しようとする試料プローブ19としてのDNAプローブが固定されたガラス基板17を半円柱プリズム3の上平面に密着させた後、該ガラス基板17の上平面にセルブロック21を密着させる。

【0024】次に、供給流路27から、細胞や生体組織から抽出されたDNAで蛍光物質が標識された被検体と緩衝液の水溶液26を供給してフローセル23内に充填させ、該フローセル23からオーバーフローした水溶液26を、排出流路29を介して回収させることにより試料プローブ19としてのDNAプローブにDNA被検体を作用させる。

【0025】そして金属薄膜17a上に固定された試料プローブ19としてのDNAプローブと水溶液中のDNA被検体とが相補する場合には互いに結合(ハイブリダイズ)し、非相補関係の場合には非結合に保たれる。

【0026】次に、試料プローブ19としてのDNAプローブとDNA被検体とがハイブリダイズするのに必要な時間が経過した後に供給流路27を介して緩衝液を供給しながら排出流路29からオーバーフローした緩衝液を回収してフローセル23内にて緩衝液を流通させながら光照射装置5から半円柱プリズム3に対し、ガラス基板17と金属薄膜17aとの境界にて収束するレーザ光を所定の臨界角以上の角度幅(例えば60~80°)で照射すると、該レーザ光は前記境界面から反射して第1受光部材15により受光され、該第1受光部材15は反射光の強度に応じた電気信号を出力する。

【0027】このとき、レーザ光が前記境界面で全反射する際に、前記境界面にエバネッセント波が発生し、一部のレーザ光が試料プローブ19側へしみ出し、該試料プローブ19とDNA被検体とが相補状態の場合には該

DNA被検体に標識された蛍光物質を、しみ出したレーザ光の電場により励起して蛍光させる。

【0028】そして蛍光物質からの蛍光は光ファイバー35を介して第2受光部材37に受光され、蛍光強度に応じた電気信号を出力する。

【0029】また、前記境界から全反射するレーザ光は第1受光部材15に受光される。その際、そのレーザ光の入射角度が所定の角度のとき、エバネッセント波が最大になり、試料プローブ19及びこれに結合したDNA被検体への吸光が最大、従って前記境界からの反射光強度が最小になって表面プラズモン共鳴角として検出される。

【0030】そして所定のサンプル時間毎に第1受光部材15により受光された前記境界からの反射光及び第2受光部材37に受光された蛍光の各強度に応じた電気信号を取り込んでA/D変換した後、RAM45のバッファ領域45aに記憶させる。

【0031】CPU41はRAM45のバッファ領域45aに記憶された各入射角に応じた反射光強度と時間との関数からなるグラフデータ及び蛍光強度と時間との関数からなるグラフデータを夫々演算処理して表示装置49に表示させる。

【0032】本実施形態は、表面プラズモン共鳴角と共にエバネッセント波により励起された蛍光物質からの蛍光により試料プローブ19と結合する被検体を検出するため、表面プラズモン共鳴角のみによる場合に比べて検出精度を向上させることができる。

【0033】また、ガラス基板17における金属薄膜17aとの境界からレーザ光が全反射する際に生じるエバネッセント波により蛍光物質を励起して蛍光させるため、外部から蛍光物質の励起光を照射して蛍光させる従来の蛍光検出法の比で励起光から蛍光を弁別する必要がなく、確実に蛍光を検出することができ、励起光によるノイズを低減して高精度に蛍光を検出することができる。

【0034】実施例この装置の応用例としては、DNAやタンパク質を金薄膜表面上に固定しておき、それと結合して蛍光標識されているDNA、タンパク質、その他のリガンドを流路に流すことにより、それらが結合する様子を連続的に表面プラズモン共鳴とエバネッセント波を用いた蛍光で同時に観測してその相互作用を観測することができる。二つの観測手法を同時に行うことにより、より信頼性のある情報が得られ、フロー系を利用して連続的に測定することにより多くの検体を処理することができる。

【0035】さらに進んだ使用好適例として、受容体とGタンパク質を用いたリガンドスクリーニングシステムがある。

【0036】生体センサーである受容体の内、その多くは7回膜貫通型という共通した構造を持つGタンパク質共役型である。このGタンパク質共役受容体はそのリガンドを結合すると、Gタンパク質を活性化してGTPの取り込みを加速させる性質を持ち、この両者をつなげた融合タンパク質はこうした両者の性質を保持している。

【0037】そこでこの融合タンパク質を表面に固定化しておき、蛍光性GTP誘導体と薬物候補物質を流路に流すと、薬物候補物質が受容体に結合し、さらに活性化させた場合にだけ蛍光性GTP誘導体は金薄膜表面近傍にとどまるので、エバネッセント波によって励起されて蛍光を発する。

【0038】従って、表面プラズモン共鳴によってサンプルの結合と共に蛍光が観測されれば、そのサンプルは融合タンパク質に結合し、かつ融合タンパク質を活性化したことになるので、細胞に情報伝達を起こすことのできる生理活性物質（＝アゴニスト）であることがわかる。

【0039】また、サンプルの結合だけが観測され、蛍光が観測されなければ、そのサンプルは融合タンパク質に結合できるが、細胞への情報伝達を遮断する物質（＝アンタゴニスト）であることがわかる。

【0040】

【発明の効果】本発明は、SPR法と蛍光検出法を組み合わせることにより被検体の特性を高精度に検出することができる。また、本発明は、被検体を蛍光検出する際には励起光等の影響をなくして蛍光を高精度に検出することができ、被検体自体の検出精度を向上することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】表面プラズモン共鳴角及び蛍光同時検出装置の概略説明図である。

【図2】センサーチップを拡大して示す断面図である。

【図3】表面プラズモン共鳴角及び蛍光同時検出装置1の電気的ブロック図である。

【図4】エバネッセント波による蛍光物質の励起作用を示す説明図である。

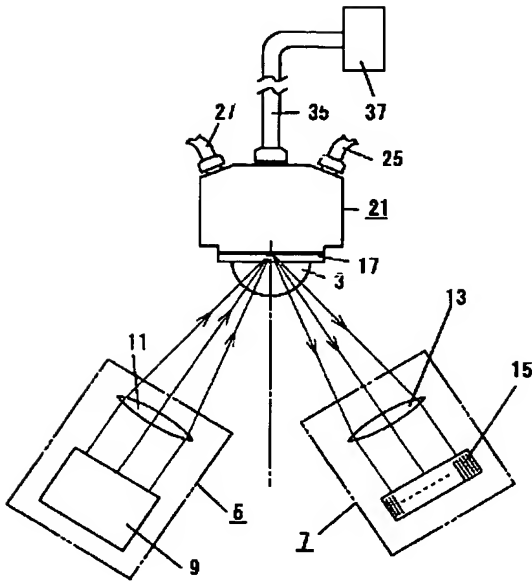
【図5】時間と表面プラズモン共鳴角の変化を示すチャートである。

【図6】時間と蛍光検出との関係を示すチャートである。

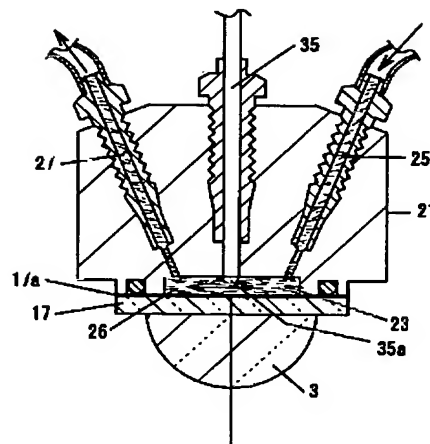
【符号の説明】

1－表面プラズモン共鳴角及び蛍光同時検出装置、3－半円柱プリズム、5－光照射装置、7－第1受光装置、17－ガラス基板、15－第1受光部材、19－試料プローブ、21－セルブロック、23－フローセル、37－第2受光部材

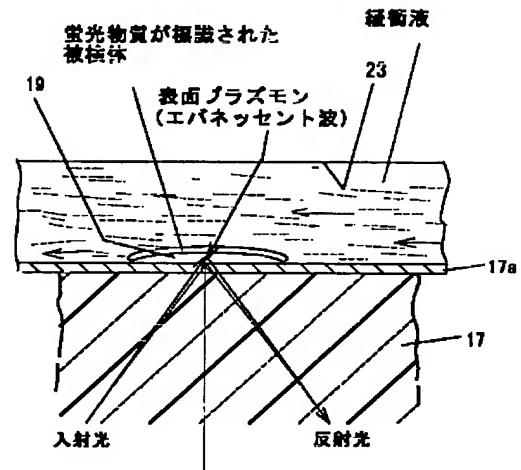
【図1】



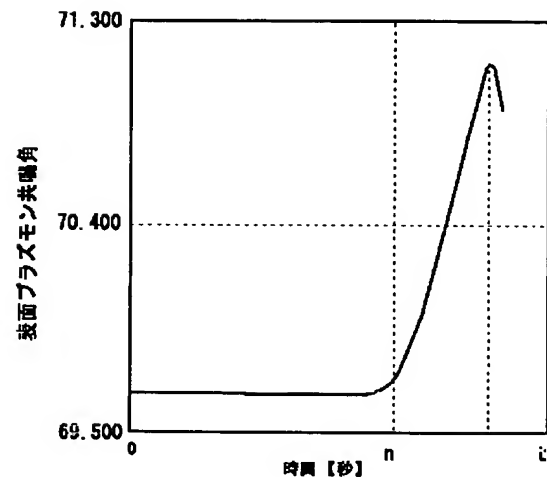
【図2】



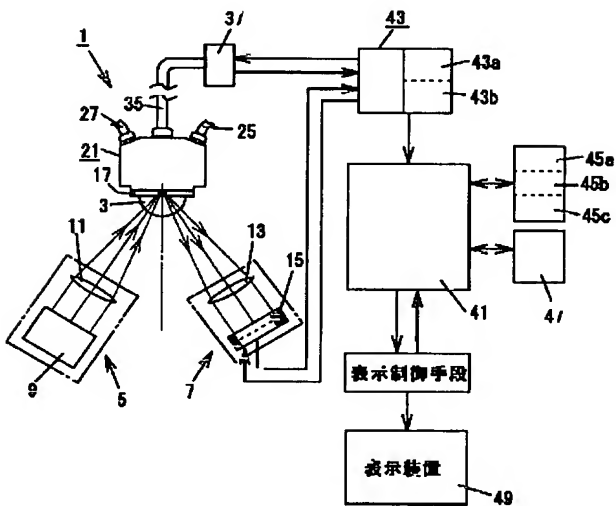
【図4】



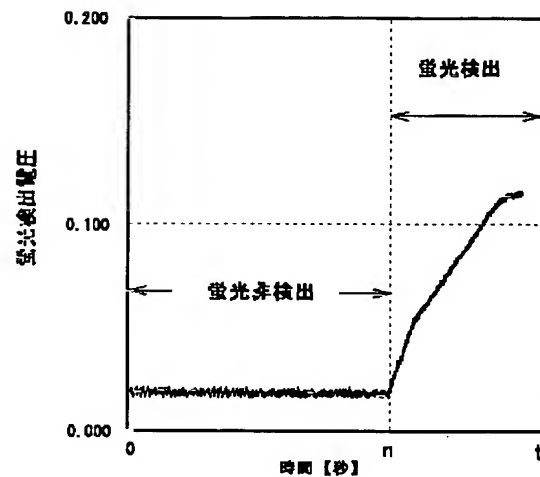
【図5】



【図3】



【図6】



【手続補正書】

【提出日】平成12年9月19日(2000.9.19)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】発明の名称

【補正方法】変更

【補正内容】

【発明の名称】 表面プラズモン共鳴角と蛍光の同時検出装置

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 表面に製膜された金属薄膜に試料プローブが固定され、光が透過可能な基板と、光源からの所定角度幅の光を密着された基板における金属薄膜の境界に照射すると共に該境界からの反射光を前記所定の角度幅に形成して第1受光部材に受光させるプリズムと、基板に密着され、光の照射領域に応じた箇所へ供給される蛍光物質が標識された被検体溶液を流通させるセルを有したセルブロックと、光が照射される基板箇所に相対するセルブロックに設けられ、試料プローブに結合した被検体に標識された蛍光物質からの蛍光を受光する第2受光部材とからなり、試料プローブに結合した被検体を表面プラズモン共鳴角及び蛍光により検出可能にした表面プラズモン共鳴角と蛍光の同時検出装置。

【請求項2】 請求項1において、第1及び第2受光部材からの電気信号を所定のサンプリング時間ごとに読み込

み、試料プローブに結合した被検体を表面プラズモン共鳴角及び蛍光により特定可能にした表面プラズモン共鳴角と蛍光の同時検出装置。

【請求項3】 請求項1において、第2受光部材は蛍光を導波する光ファイバーと、光ファイバーを介して導波される蛍光の光強度に応じた電気信号を出力する受光素子とからなる表面プラズモン共鳴角と蛍光の同時検出装置。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0001

【補正方法】変更

【補正内容】

【0001】

【発明が属する技術分野】 本発明は、例えば細胞、ウイルス、バクテリア等の蛋白質、糖、酵素やDNA、RNA等のヌクレオチド等の各種被検体の特性を検出する表面プラズモン共鳴角と蛍光の同時検出装置に関する。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0007

【補正方法】変更

【補正内容】

【0007】 本発明は、上記した従来の欠点を解決するために発明されたものであり、その課題とする処は、SPR法と蛍光検出法を組み合わせることにより被検体の特性を高精度に検出することができる表面プラズモン共鳴角と蛍光の同時検出装置を提供することにある。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0008

【補正方法】変更

【補正内容】

【0008】また、本発明の他の課題は、被検体を蛍光

検出する際には励起光等の影響をなくして蛍光を高精度に検出することができ、被検体自体の検出精度を向上することができる表面プラズモン共鳴角と蛍光の同時検出装置を提供することにある。

フロントページの続き

(72)発明者 田中 孝治
名古屋市港区九番町1丁目1-1 九番団
地3棟920号室

(72)発明者 米田 英克
愛知県日進市藤島町長塚72番地50

Fターム(参考) 2G043 AA01 CA03 DA05 EA01 EA10
FA02 HA01 HA05 HA08 KA09
LA03 NA05
2G057 AA01 AA04 AB04 AC10 BA05
DB01 DB03
2G059 AA01 BB14 DD13 EE02 EE07
EE12 FF03 GG01 JJ11 JJ12
JJ17 JJ21 KK04 MM09